

AG

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-031585

(43)Date of publication of application : 06.02.2001

(51)Int.Cl.

A61K 35/80

A61K 31/00

(21)Application number : 11-200082

(71)Applicant : NAGASE & CO LTD  
RIKEN VITAMIN CO LTD

(22)Date of filing : 14.07.1999

(72)Inventor : KOBAYASHI AKIO  
HASHIMOTO MINORU  
NAKANO TAKAHISA  
TAMURA SHINYA  
HIDANO NAOKO

## (54) ANTICANCER SEAWEED EXTRACT

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To find out a component exhibiting high anticancer effect and safety from daily foods and develop a method of efficiently extracting it.

SOLUTION: By extracting a seaweed, particularly a brown algae, with an organic solvent, e.g. methanol, ethanol, propanol, acetone or hexane, or the hydrous solvent containing a suitable concentration of water, the substance of inducing cell apoptosis or a mixture between the substance and an immunopotentiator is obtained.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-31585

(P2001-31585A)

(43) 公開日 平成13年2月6日 (2001.2.6)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 6 1 K 35/80		A 6 1 K 35/80	Z 4 C 0 8 8
31/00	6 3 5	31/00	6 3 5
	6 4 3		6 4 3 D

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平11-200082

(22) 出願日 平成11年7月14日 (1999.7.14)

(71) 出願人 000214272

長瀬産業株式会社

大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号

(71) 出願人 390010674

理研ビタミン株式会社

東京都千代田区三崎町2丁目9番18号

(72) 発明者 小林 暁生

東京都練馬区旭町1-18-4

(72) 発明者 橋本 実

千葉県千葉市美浜区幸町1-3-5-505

(74) 代理人 100063484

弁理士 箕浦 清

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガン抑制海藻抽出物

(57) 【要約】

【課題】 日常摂取している食品から、ガン抑制効果が高く、かつ、安全性の高い成分を見だし、その効率的な抽出法を開発することを課題とする。

【構成】 海藻、特に褐藻類をメタノール、エタノール、プロパノール、アセトンあるいはヘキサン等の有機溶剤、またはそれらの適当な濃度の含水物で抽出することにより、細胞のアポトーシス誘導物質またはアポトーシス誘導物質と免疫向上物質との混合物が得られ課題が達成される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、アセトンおよびヘキサンの中から選ばれた 1 種または 2 種以上の混合物を使用して海藻から抽出して得られることを特徴とするアポトーシス誘導によるガン抑制効果を有する海藻抽出物。

【請求項 2】 65 容量%以下の水の共存下にメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、もしくはブタノールの 1 種または 2 種以上の混合物を使用して海藻から抽出して得られることを特徴とするアポトーシス誘導および免疫向上によるガン抑制効果を有する海藻抽出物。

【請求項 3】 海藻が褐藻類である請求項 1 または 2 記載のガン抑制効果を有する海藻抽出物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、ガン細胞にアポトーシスを誘導する、海藻抽出物からなる新規なガン抑制剤およびその抽出方法、並びにアポトーシスを誘導する成分と共に免疫賦活を誘導する成分を同時に抽出する方法に関するものである。

**【0002】**

【従来の技術】 ガンが脳血管疾患を抜いて、日本での死因の第一位になったのは 1981 年であり、その後もガンによる死者の数は増え続けている。このガンによる死者の数を減少させるために種々の合成化学薬物が抗ガン剤として臨床に供されているが、これらの薬物はその性質上重篤な副作用を避けることができないのが実情である。

【0003】 このような状況下において、ガン抑制に有効な食品成分が着目され数多く報告されるようになってきた (Food Phytochemical in Cancer Prevention I and II, ACS, Washinton (1994))。

【0004】 日本、韓国などで古来より食用として利用されてきた海藻は、生命の源である海の中で養分を吸収して育ち、ビタミン、ミネラル、食物繊維などを豊富に含んでおり、健康食品素材として親しまれてきたが、最近では生活習慣病を予防するという機能性も注目されるようになってきた (J.Nutr.129, 146~151, 1999)。

【0005】 海藻成分に関しては、水溶性成分である多糖類、例えばフコイダンやアルギン酸などによる抗ガン活性は数多く報告されている (日本網内系学会誌, 22, 269(1983) : Kitasato Arch. of Exp. Med., 60, 105 (1987) : 日本水産学会誌, 55, 1265 (1989) : Anticancer Res., 13, 2045 (1993) : Carbohydr. Res., 224, 343 (1993) : Anticancer Res., 13, 2011 (1989)) が、脂溶性成分の抗ガン活性についての報告は少ない。野田らは海藻の脂溶性成分の抗ガン活性を有することを報告しているが、その試験は投与ルートが腹腔内からであり、また、抗ガン活性の作用機作については触れてい

い (日本水産学会誌, 55, 1265 (1989))。

【0006】 また、海藻の水溶性成分であるフコイダンやアルギン酸等の多糖類はその抗ガン活性が免疫系の向上によるものであることが報告されているが、それらは、塩酸水 (Cancer Res., 51, 741 (1991)) や水 (Proc. 10th Int. Seaweed Symp. vol12, 109 (1982)) による抽出によるもので、アルコール類のような有機溶剤での抽出は報告されていない。

**【0007】**

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、日常摂取している食品から、ガン抑制効果が高く且つ安全性の高い成分を見出し、その効率的な抽出方法を開発することを課題とするものである。

**【0008】**

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題に鑑み、ガン抑制効果を有する食品素材について鋭意研究を行った結果、海藻の脂溶性成分に強いガン抑制効果を有することを見出し本発明を完成させたものである。

【0009】 抗ガン剤による細胞死は、薬剤により障害の蓄積した細胞が機能不全に陥った結果、受動的に起こるというのが過去では一般的な考え方であった。しかし、細胞生物学研究の進展に伴って、生理的な細胞死の多くはアポトーシスと呼ばれる遺伝的にプログラムされた機構により進展することが明らかになってきた。アポトーシスは核クロマチンの凝縮や DNA の断片化などによって特徴付けられる。今日では、抗ガン剤による細胞死でもアポトーシスのプロセスが進行することが判明している (特公平 5-65491 号公報)。従って、食品成分でガン細胞にアポトーシスを誘導し、ガン抑制効果を示すものは安全性の観点からも有用な抗ガン剤と成り得る。

【0010】 本発明は、アポトーシスを誘導するガン抑制効果を発現する食品成分を検索し、海藻の脂溶性成分が著しい効果を有することを見出し、更には 50 容量%含水エタノールのような、特定の含水率の含水親水性溶剤を抽出溶剤として使用することにより、脂溶性のガン抑制成分と共に、水溶性のフコイダンやアルギン酸等の多糖類も同時に抽出され、ガン抑制効果がより効果的に発現されることを見出したものである。

【0011】 海藻は世界的に分布している生物資源であり、現在の利用可能性を推定することは困難であるが、相当量の未利用資源が存在することは確実であり、また、わかめ、昆布あるいはモズク等の食用の海藻は養殖技術が構築されており資源的な確保については問題がなく、原料的にも有利である。

**【0012】**

【発明の実施の形態】 海藻には褐藻類、紅藻類、緑藻類あるいは珪藻類等があるが、本発明に利用される海藻としては特に褐藻類が有用で、例えばわかめ、わかめのメ

カブ、モズク、アラメ、昆布、ヒジキ、ホンダワラ、アカモク、ヒバマタ等があげられる。これらの海藻からの本発明の有効成分の抽出において、原料である海藻の状態は生または乾燥等の状態があるが、本発明においては原料の生または乾燥物等の状態は問わず、また、その形状を限定するものではないが、抽出の効率を上げるために粉末または雷潰してスラリー状にして利用することが好ましい。

【0013】本発明の脂溶性のガン抑制物質の抽出は有機溶剤を使用して行われる。その有機溶剤としては、ヘキサン、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、酢酸エチル、トルエン、プロピレングリコール等が挙げられるがヘキサン、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールあるいはブタノール等がより好ましく、これらの内の1種または2種以上の混合物として使用することが可能である。更には、これらの中でも特に食用として使用されるエタノールが好ましい。

【0014】本発明のガン抑制物質をこれらの溶剤を使用して抽出するに際して、水の存在は原料由来の水分も含めて含水率が65容量%まで許容できる。更には、水を含むことにより脂溶性のアポトーシス誘導効果を有するガン抑制物質と共に水溶性の免疫向上効果を有する多糖類が同時に抽出され、ガン抑制効果をより高める組成物とすることが可能である。有機溶剤の比率が高くなるほどアポトーシス誘導物質の抽出量が増え、また、水の比率が高くなるほど免疫向上物質の抽出量が増えるがアポトーシス誘導物質の抽出量を大きく低下することなく、これらの両活性物質を同時に抽出する含水率は好ましくは25～50容量%の範囲である。

【0015】抽出は加熱下でも低温下でも可能であるが、低温程抽出に時間を要し、数時間から数日程度を必

要とする場合があり、加熱還流下で1～8時間抽出するのが効率的で好ましい。

【0016】抽出物はエタノールを使用した場合はそのままあるいはエタノールを蒸留除去して使用できる。また、その他の溶剤を用いた場合はその溶剤を蒸留除去した液状物として、更には濃縮した濃縮液として、あるいはそれらを乾燥した乾燥物として使用することができる。また、溶剤を蒸留除去した液状物の腐敗を防止するために、または形状を保つために必要な補助物質を使用することが可能である。

【0017】このようにして得られた抽出物は、それ自体または適当な賦形剤と混合することにより、液体、粉末、顆粒、錠剤、あるいはカプセル剤などの形態に調製し経口によって摂取に供することが可能である。あるいはまた、それらを御飯、スープ、飴、ゼリー、錠菓、飲料、麺、せんべい、和菓子、冷菓等の食品に配合・添加して摂取することも可能である。

【0018】

【実施例】以下、実施例をもって本発明を説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

【0019】実施例及び比較例の海藻抽出物の調製  
乾燥メカブ1kgを裁断し冷流水にて10分間脱塩した後、12リットルの85容量%エタノールを加え（約75容量%エタノール濃度となる）、2時間加熱還流抽出した。これを濾過し、濾液を減圧下で濃縮し136gの濃縮物を得た（実施例3：サンプル③）。この抽出液の脂質は20.3%、全糖（フェノール硫酸法）9.8%、硫酸基含量1%、塩分（Mohr法）20.8%であった。

【0020】同様に、表1に示す各実施例及び比較例の試験サンプルを調製した。

【0021】

【表1】

溶 剤 \ 海 藻	わかめメカブ	アラメ	アカモク
エタノール	実施例1 サンプル①	実施例6 サンプル⑧	実施例9 サンプル⑫
メタノール	実施例2 サンプル②	実施例7 サンプル⑨	
25容量%含水エタノール	実施例3 サンプル③		
50容量%含水エタノール	実施例4 サンプル④		
65容量%含水エタノール	実施例5 サンプル⑤	実施例8 サンプル⑩	
70容量%含水エタノール	比較例1 サンプル⑥	比較例3 サンプル⑪	
75容量%含水エタノール	比較例2 サンプル⑦		

表1：実施例及び比較例サンプル

【0022】試験－1：アポトーシス評価

HL60細胞（ヒト白血病細胞）をガン組織モデルとし

て使用した。

【0023】HL60細胞5×10<sup>4</sup>個を6 well plateに

播種し、そのまま37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにておよそ18時間培養する。その後、各well内の細胞数を血球計算盤にて算出し、実施例および比較例の試験サンプルをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈し終濃度が各々1mg/mlになるように添加する。試験サンプルを添加後、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて24時間培養を継続し、細胞を回収して、細胞数・生存率のトリパンブルー染色による測定とDNA断片化の検出をそれぞれ行った。その結果を図1に示した。

【0024】Cont.は試験試料無添加の対照を示し、試験試料の添加されていないリン酸緩衝生理食塩水（PBS）であり、BFAはブレフェリンジンAでポジティブコントロールである。BFAはアポトーシスを誘導することが知られており、この評価の妥当性を証明するものである。

【0025】本発明によるサンプル①～⑤、⑧～⑪および⑫はトリパンブルーによる染色で死細胞が増加している。これに対して比較例であるサンプル⑥、⑦および⑫はアポトーシス効果が不十分であった。

【0026】また、代表的なサンプルについては共培養4時間後の細胞からDNAを抽出し、DNAの断片化をアガロース電気泳動法により検出した。その結果を図4の図面代用に示した。

【0027】MはDNA分子量マーカーであり、NCはリン酸緩衝生理食塩水であり、SFはブレフェリンジンAを示している。実施例1（サンプル①：電気泳動写真No.149）、実施例3（サンプル③：電気泳動写真No.144）、実施例4（サンプル④：電気泳動写真No.150）、実施例5（サンプル⑤：電気泳動写真No.147）および実施例8（サンプル⑧：電気泳動写真No.151）は細胞から抽出したDNAに顕著なラダーが認められ、紛れもなくアポトーシスが誘導されることが示された。

【0028】これに対して比較例1（サンプル⑥：電気泳動写真No.146）および比較例2（サンプル⑦：電気泳動写真No.145）では明瞭なラダーは認められなかった。

【0029】試験-2：マクロファージの活性評価（NO産出能と貧食能）

5×10<sup>5</sup>個のRaw264.7（マウス由来マクロファージ様細胞株）細胞を24 well plateに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて50U/ml INF-γ・サンプル（終濃度1mg/ml）と24時間培養する。培養終了後、培養上清を回収し、上清中のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>量をグリース反応試薬系により定量した。その結果を図2に示した。

【0030】LPSはリポポリサッカライドで、NO産出のポジティブコントロールであり、この評価系が妥当であることを示している。

【0031】実施例3（サンプル③）、実施例4（サンプル④）および実施例5（サンプル⑤）にはマクロファージを活性化（NO産出能を向上）することが示された。

【0032】更に、実施例3（サンプル③）および実施例4（サンプル④）については、Raw264.7細胞を回収し、1×10<sup>6</sup>を培地にてcell suspensionとし、15ml遠心管に移す。貧食させるlatexビーズとサンプルとを終濃度1mg/mlになるように添加し、37℃湯浴にて6時間振盪する。

【0033】その後、cell suspensionを超音波により粉碎し、調製したcell lysateを96 well plateに移し（100μl）、プレートリーダーで蛍光強度（ex 485nm：em 530nm）を測定した。

【0034】その結果を図3に示した。

【0035】実施例3（サンプル③）および実施例4（サンプル④）は実際にマクロファージの貧食能を向上させることが認められた。

【0036】

【発明の効果】本発明の方法により製造された海藻抽出物は、ガン細胞にアポトーシスを誘導し、また、アポトーシス誘導と同時に免疫賦活を誘導し、ガンを抑制する効果を有するものである。

【0037】本発明に使用される海藻は古来食材として利用されてきたもので、本発明品は安全で、各種食品に添加しあるいはカプセルや錠剤等の形態で手軽に摂取することが可能である。

【図面の簡単な説明】

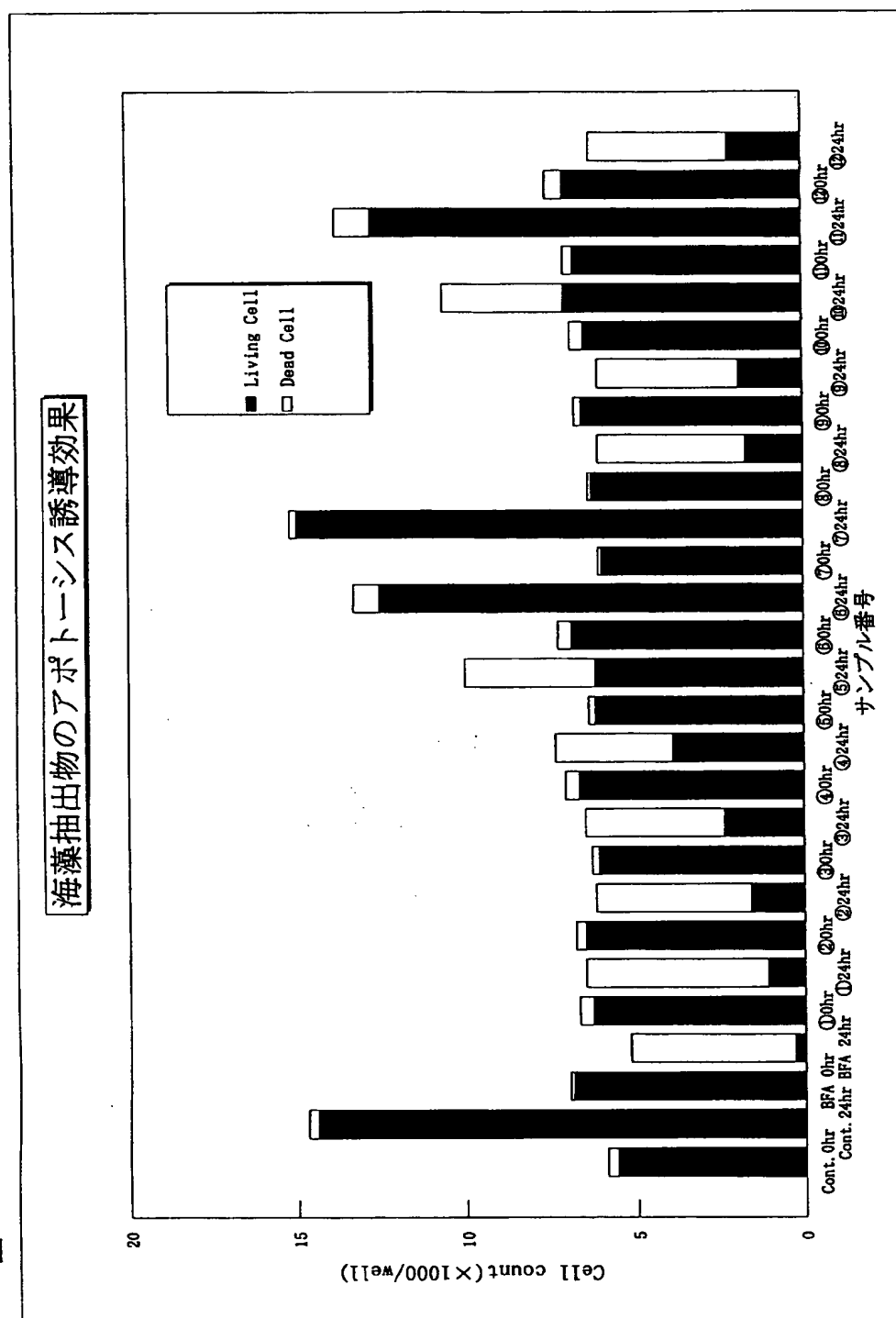
【図1】本発明の実施例1～12の海藻抽出物のガン細胞にアポトーシスを誘導する効果を示した図表で、対照品、比較品と比較して示してある。

【図2】本発明の実施例1, 3, 4, 5, 6の海藻抽出物のNO産生能を示した図表で、対照品、比較品と比較して示してある。

【図3】本発明の実施例3, 4の海藻抽出物の貧食能を対照品、および比較品と比較して示してある。

【図4】本発明の実施例1, 3, 4, 5, 6, 7, 8と対照品および比較品とガン細胞を共培養後抽出されたDNAの断片化をアガロース電気泳動法により検出した結果を示した図面代用写真である。

1



【図 2】

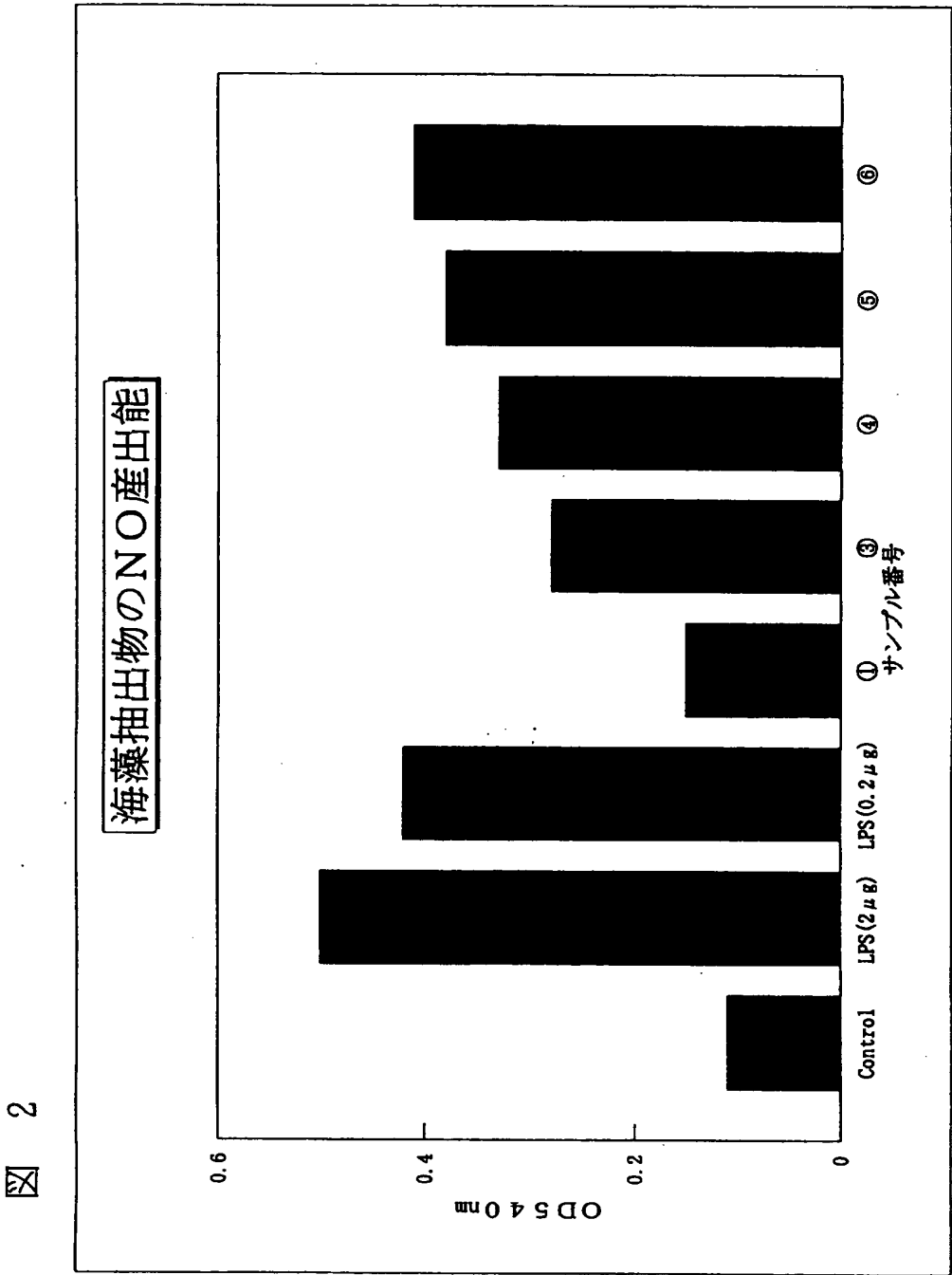
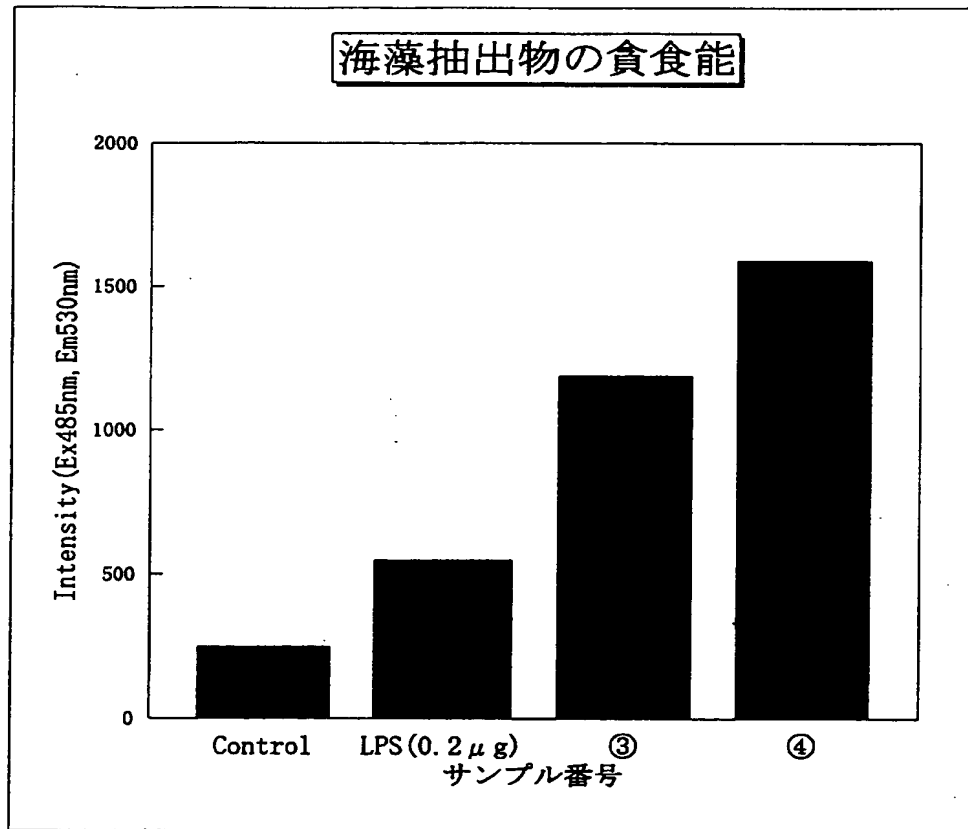


図 2

【図3】

図 3





【図4】

M : マーカ-DNA	サンプル○4 : 150
NC : Contragl	サンプル○5 : 147
SF : BFA	サンプル○6 : 146
サンプル○1 : 149	サンプル○7 : 145
サンプル○3 : 144	サンプル○8 : 151

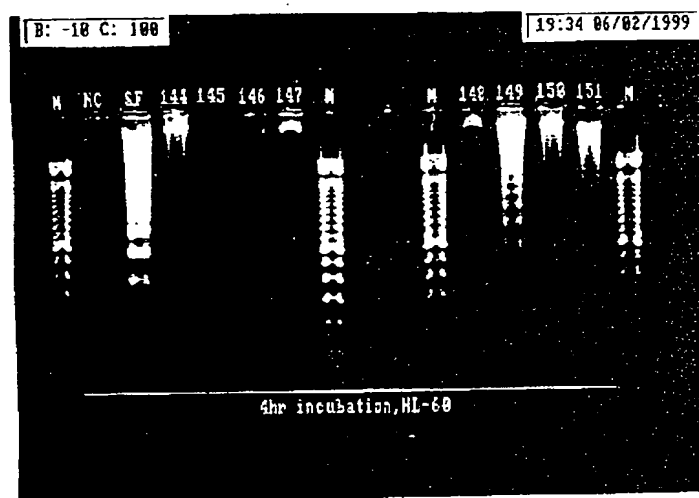


図4

フロントページの続き

(72)発明者 仲野 隆久  
東京都江戸川区東小松川3-32-7  
(72)発明者 田村 真也  
東京都中央区日本橋小舟町10-9 長瀬産  
業株式会社内

(72)発明者 肥田野 尚子  
東京都中央区日本橋小舟町10-9 長瀬産  
業株式会社内  
Fターム(参考) 4C088 AA12 AA13 AA14 AA15 AC15  
BA08 BA10 NA14 ZB26 ZC41

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**